

NOME: Catarina Isabel Proença Duarte Guerreiro  
DEPARTAMENTO: DPASA, Faculdade de Medicina Veterinária  
DOUTORAMENTO EM: Ciências Veterinárias  
ORIENTADOR: Carlos Mendes Godinho de Andrade Fontes (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa)  
CO-ORIENTADORES: Francisco Miguel Portela da Gama e Lucília Maria Alves Ribeiro Domingues (Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho)  
DATA: Setembro de 2008  
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

Mecanismos moleculares de hidrólise da parede celular vegetal: desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas para os módulos de ligação a carboidratos

## RESUMO

O xiloglucano é a principal hemicelulose das paredes celulares vegetais. Neste trabalho apresentam-se estudos bioquímicos e estruturais sobre a xiloglucanase Xgh74A do *Clostridium thermocellum*. São também estudados módulos de ligação a carboidratos (CBMs) com afinidade para o xiloglucano, o CtCBM30 e o CtCBM44 da CtCel9D-Cel44A. O módulo C-terminal revelou-se um CBM, sendo o membro fundador da família 44. As estruturas cristalográficas desses CBMs mostram locais de ligação aos polissacáridos com topologia do Tipo B, nos quais os triptofanos representam um papel importante no reconhecimento dos ligandos. A Cel44A é uma endoglucanase com actividade xilanásica, cuja acção é potenciada pelo CtCBM44. Estudos bioquímicos e estruturais sobre a CtLic26A-Cel5E são também apresentados, sendo a CtLic26A uma  $\beta$ -1,4- $\beta$ -1,3-glucanase e a Cel5E uma endo- $\beta$ -1,4-glucanase. A estrutura tridimensional da CtLic26A revelou os mecanismos estruturais que modulam a especificidade da enzima. Neste trabalho são pesquisadas novas aplicações biotecnológicas para os CBMs. Efectuou-se um ensaio com frangos de carne, suplementando dietas à base de cevada com derivados recombinantes da CtLic26A-Cel5, com e sem CtCBM11, e com uma enzima comercial. A fusão de quatro péptidos antimicrobianos com a CipA do CtCBM3 originou recombinantes com elevada afinidade para celulose cristalina, indicando que os CBMs poderão fixar moléculas bioactivas a materiais celulósicos.

Palavras-chave: *Clostridium thermocellum*; glicósido hidrolases; módulos de ligação a carboidratos; frangos de carne; péptidos antimicrobianos; biotecnologia

## TÍTULO DA DISSERTAÇÃO EM INGLÊS:

Molecular mechanisms of plant cell wall hydrolysis: developing novel biotechnological applications for carbohydrate-binding modules

### ABSTRACT

Xyloglucan (XG) is the major plant cell wall hemicellulose. Biochemical and structural studies on a xyloglucanase, Xgh74A, from *Clostridium thermocellum* are presented here. In addition, the carbohydrate-binding modules (CBMs) from *C. thermocellum* Cel9D-Cel44A, CtCBM30 and CtCBM44, which recognize XG, are characterized in this work. CtCel9D-Cel44A's C-terminal module of unknown function is a CBM, constituting the founder member of family 44. Structural studies revealed that both CtCBM30 and CtCBM44 present Type B binding site topologies where tryptophans play an important role in ligand recognition. Cel44A is an endoglucanase domain displaying some xylanase activity, which action is potentiated by CtCBM44 through a targeting effect. Biochemical and structural studies on CtLic26A-Cel5E are also described here. CtLic26A is a mixed  $\beta$ -1,4- $\beta$ -1,3-glucanase and Cel5E an endo- $\beta$ -1,4-glucanase. The three-dimensional structure of CtLic26A provides insights in the mechanism of lichenan recognition by family 26 glycoside hydrolases. Finally, novel biotechnological applications for CBMs were investigated. An experiment was conducted where a barley-based diet for broilers was supplemented with CtLic26A-Cel5 derivatives, with or without CtCBM11, and with a commercial enzyme. The fusion of four antimicrobial peptides with CipA from CtCBM3 originated recombinants with high affinity for crystalline cellulose, indicating CBMs could fix bioactive molecules to cellulose.

Key words: *Clostridium thermocellum*; glycoside hydrolases; carbohydrate-binding modules; poultry; antimicrobial peptides; biotechnology